

ÉTUDE PAR RMN DES CONFORMATIONS DU COMPLEXE L-VALINE–Dy³⁺ À PARTIR DES DÉPLACEMENTS CHIMIQUES INDUITS

J. OUARZAZI et J.C. MOSSOYAN *

*Laboratoire de Chimie de Coordination D22, Université de Provence, Centre de Saint-Jérôme,
Avenue Escadrille Normandie-Niemen, 13397 Marseille Cedex 13 (France)*

(Reçu le 4 décembre 1989)

ABSTRACT

From ¹H NMR data, binding constants β for the L-valine–Dy complex have been computed and thermodynamic parameters established. Positive ΔH^\ominus and ΔS^\ominus values confirm both the strongly ionic character of the Dy bonding and the endothermicity of complex formation.

From experimental induced-shift data, separation of contact and dipolar shifts has been effected for L-valine nuclei, through temperature variation.

Conformational fitting based on dipolar shift data has allowed location of the paramagnetic cation, computation of the fractional populations of rotamers and assignation of the chemical shifts of γ carbons.

The weakness of the L-valine–Dy interactions is demonstrated by the lack of change in the rotamer populations.

RÉSUMÉ

Les valeurs des constantes de complexation β du système L-valine–Dy calculées par RMN, entre 300 et 340 K, à partir des déplacements induits des ¹H ont permis d'établir les paramètres thermodynamiques de formation du complexe L-valine–Dy. Les valeurs positives de ΔH^\ominus et de ΔS^\ominus impliquent que la réaction de complexation est endothermique et confirment le caractère fortement ionique de la liaison.

Les interactions dipolaire et de contact des noyaux ¹H et ¹³C ont été séparées à partir d'une méthode de séparation à température variable.

L'exploitation des données de déplacements dipolaires a permis de préciser la position du cation Dy aux voisinages du site de complexation, de calculer les populations des rotamères du complexe L-valine–Dy et d'attribuer les signaux de résonance des carbones C γ .

Les interactions entre le Dy et la L-valine sont si faibles qu'on n'observe aucun changement dans les populations des rotamères.

* Auteur à qui les correspondances doivent être adressées.

INTRODUCTION

Les cations de lanthanides sont couramment utilisés en RMN comme sondes extrinsèques pour approcher les conformations préférentielles des molécules flexibles en solution [1–3], pour simplifier les systèmes de spins fortement couplés et attribuer les déplacements chimiques des noyaux dont les raies de résonances se présentent sous forme d'un massif mal résolu [4]. Plus récemment, on les a utilisés pour suivre dans le corps humain le devenir de certains éléments chimiques tels que le potassium et le sodium [5–7], et comme agents de contraste en imagerie RMN [8].

En milieu acide les ions lanthanides forment avec les aminoacides et peptides monocarboxyliques des complexes ioniques 1:1 à constantes de complexation peu élevées [9,10]. Les perturbations magnétiques qu'ils induisent au niveau des noyaux résonants, sont généralement faibles et essentiellement de type dipolaire au niveau des protons [11], ce qui laisse à penser que la complexation ne provoque que des modifications structurales minimales du ligand. Cependant, peu de résultats ont été publiés à ce jour sur les conformations des systèmes labiles en solution. Non point que le sujet soit inintéressant, mais plus simplement parce que les réponses aux questions liées à la séparation des contributions dipolaires et de contact, à la symétrie axiale des complexes, à l'invariance de la constante de couplage hyperfin noyau-électron dans une série de complexes de lanthanides isostructuraux soit étaient contradictoires [12], soit remettaient en cause certaines hypothèses de travail [13], empêchant ainsi des études conformationnelles systématiques sur ces systèmes.

BUT DU TRAVAIL

Notre objectif est d'établir les conformations privilégiées du complexe L-valine-Dy en solution aqueuse acide sans faire intervenir les populations de rotamères obtenues à partir des relations de type Karplus [14] et des valeurs de constantes de couplages 2J et 3J . Aussi l'approche que nous avons utilisée diffère quelque peu de celles que l'on rencontre dans la littérature [15]. Nous avons procédé en deux temps. Nous avons d'abord déterminé la position du cation paramagnétique Dy par rapport à un système d'axes centré sur le carbone du groupement carboxylate, ox étant dirigé suivant la liaison $C0-C\alpha$ et oy étant contenu dans le plan $C0C\alpha C\beta$ (Fig. 1), en utilisant les rapports de déplacements dipolaires des noyaux dont les positions sont invariantes par rapport au repère orthonormé (voir Fig. 1). Une fois le cation Dy positionné, les termes géométriques des autres noyaux ont été calculés pour être ensuite comparés aux données expérimentales corre-

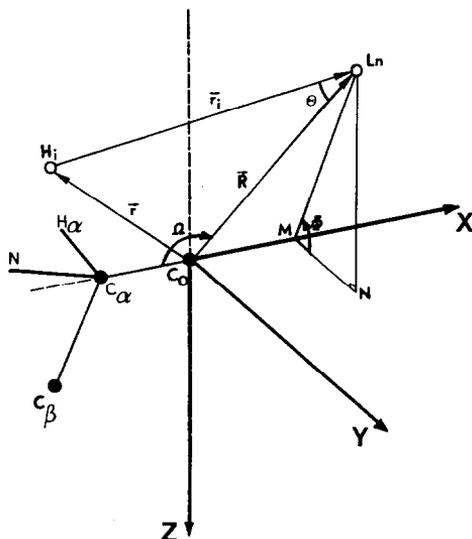


Fig. 1. Système d'axes de référence utilisé pour la détermination de la conformation du complexe L-valine-dysprosium en solution aqueuse acide. Le carbone C0 est pris à l'origine des axes, l'axe des X est dirigé suivant C α -C0, et le plan X-Y contient C β .

spondantes. Les paramètres ajustables étant les angles de rotation et les pourcentages de rotamères.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Potentiométrie

L'ajustement des pD a été réalisé à l'aide d'un pH-mètre Metrohm-605, couplé à une micro-électrode Metrohm AG 9100, dans une enceinte thermostatée à $25 \pm 1^\circ\text{C}$, sous Argon N55. Les mesures ont été effectuées sur des solutions contenant 10^{-2} et 10^{-1} M de L-valine libre puis complexée par Dy. La force ionique du milieu a été maintenue constante par KCl 2M.

RMN

Après ajustement des pD ($\text{pD} = \text{pH} + 0,4$) des solutions à l'aide de DCl et de KOD, dans les conditions expérimentales énumérées ci-dessus, les spectres RMN des ^1H et des ^{13}C ont été enregistrés respectivement à 200 et à 50 325 MHz sur un spectromètre Bruker AM200. Les spectres ^1H , pour des rapports C_M/C_L allant de 0 à 5, ont été obtenus à 300, 310, 320, 330 et 340 K, avec une résolution de 0,3 Hz/point, en employant le TSP-d4 (sel de sodium de l'acide 3-(triméthylsilyl)propionique) comme référence interne. Chaque spectre a nécessité en moyenne 100 accumulations. Les spectres en

^{13}C ont été obtenus dans des tubes de 10 mm de diamètre en employant le dioxane comme référence interne. Les spectres ^{14}N ont été obtenus avec la L-valine à la concentration 0,1 M en employant NH_4Cl comme référence interne. Les rapports C_M/C_L étant 0, 0,4 et 0,5.

RÉSULTATS

Détermination des pK par RMN

La technique de titrage RMN est intéressante lorsque les autres techniques d'investigation sont difficilement applicables (systèmes très acides ou très basiques, molécules à constantes de dissociation peu élevées, métal-coordinat de faible stabilité...). Elle permet non seulement d'établir l'ordre et la nature des groupements successivement déprotonés mais aussi de calculer des pK et les β des systèmes paramagnétiques, si l'on opère dans des conditions expérimentales identiques.

Pour calculer les paramètres intrinsèques β et Δ du système L-valine–Dy, nous avons besoin de connaître la valeur du rapport H/K_2 [16]. Pour deux espèces en échange rapide par rapport à l'échelle de temps de la RMN, ce rapport est donné par l'expression [17]:

$$\text{H}/K_2 = (\delta_{L_2} - \delta^0)/(\delta^0 - \delta_{L_3}) \quad (1)$$

où δ^0 est le déplacement chimique d'un noyau donné de la L-valine libre et δ_{L_3} et δ_{L_2} sont respectivement les déplacements chimiques du même noyau dans l'espèce totalement protonée L3 et dans l'espèce déprotonée L2.

L'examen de la courbe $\text{pH} = f(\delta^0)$ (Fig. 2) montre que la constante de dissociation du groupement carboxyle de la L-valine se situe dans l'intervalle de pH compris entre 2,2 et 2,8. Cette constante calculée à partir d'une régression non linéaire effectuée sur les couples de points (pH, δ^0) conduit à la valeur $\text{p}K_2 = 2,42$. L'accord entre cette valeur et celle proposée dans la littérature [18] confirme que la vitesse d'échange entre la forme protonée et la forme déprotonée de la L-valine est rapide par rapport à l'échelle de temps de la RMN.

Déplacements chimiques ^{13}C , ^1H , ^{14}N induits par Dy

Malgré sa faible abondance naturelle et sa sensibilité médiocre, le ^{13}C est considéré comme le noyau le plus adapté à l'étude par RMN des conformations des molécules flexibles en solution. Si celui-ci ne pose pas de problèmes particuliers pour l'étude d'échantillons dont les concentrations en solution sont élevées ($C_L \geq 1$ M), il n'en est plus de même lorsqu'on aborde les solutions diluées. Pour des molécules telles que la L-valine, à des concentrations où le monomère est prépondérant ($C_L \leq 10^{-2}$ M), l'enregistrement des

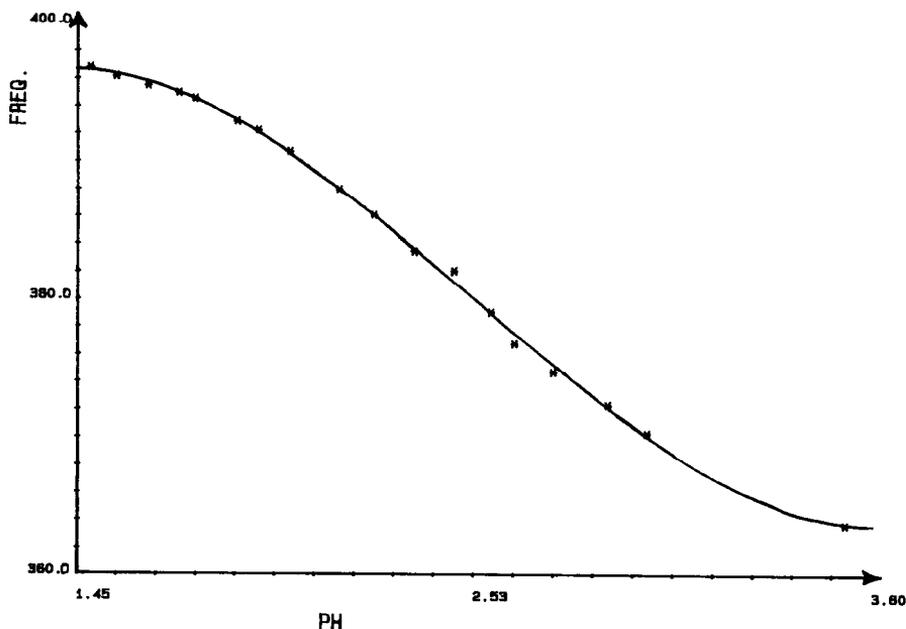


Fig. 2. Variations du déplacement chimique du proton $H\alpha$ de la L-valine libre en fonction du pH. La constante de dissociation du groupement carboxyle est donnée par la mesure du pH au point d'inflexion de la courbe ($pH = pK$).

spectres nécessite un temps d'accumulation élevé, y compris lorsqu'on les réalise à des champs élevés. La complexation du ligand par le cation paramagnétique, en modifiant les temps de relaxations nucléaires, élargit les raies de résonance, ce qui conduit à une perte de résolution et à un accroissement du temps d'accumulation nécessaire à la détection des raies de résonance. Aussi, l'étude conformationnelle d'un échantillon en solution diluée est aléatoire voire même impossible, par RMN du ^{13}C en abondance naturelle.

Pour éviter les phénomènes d'autoassociation qui risquent d'influencer les déplacements chimiques de l'espèce monomère et obtenir en un temps

TABLEAU 1

Déplacements induits en champ faible et en champ fort ($C\alpha$), des ^{13}C de la L-valine enrichie à 85%, en présence de Dy^{3+} . L-valine, 10^{-2} M (KCl 2 M); $pD = 4,45$; $T = 310$ K

C_M/C_L	C0	$C\alpha$	$C\beta$	$C\gamma_1$	$C\gamma_2$
1,0	650,7	93,6	110,2	50,9	59,3
2,0	1382,1	197,4	235,3	107,9	126,4
3,0	1926,5	285,3	332,8	150,7	178,5
4,0	2355,3	353,3	406,5	187,6	216,1
5,0	2864,6	408,3	487,8	220,1	261,1

Déplacements chimiques en Hz à 50 325 MHz.

TABLEAU 2

Déplacements induits en champ faible des protons de la L-valine en présence de Dy³⁺. L-valine, 10⁻² M (KCl 2 M); pD = 3,82; T = 310 K

C _M /C _L	H α	H β	CH ₃ (1)	CH ₃ (2)
0,5	245,3	157,1	—	—
1,0	480,2	305,8	—	—
1,5	700,8	450,9	244,6	216,8
2,0	912,6	586,8	320,3	281,8
2,5	116,4	712,8	391,0	344,6
3,0	1289,1	824,1	453,7	399,3
4,0	1670,8	1070,3	587,6	516,8
5,0	1996,5	1280,8	704,8	618,1

Déplacements chimiques induits en Hz à 200 MHz.

relativement court les spectres en ¹³C, nous avons utilisé un échantillon de L-valine, à la concentration 10⁻² M, enrichi à 85% en ¹³C. Les données de déplacements induits des ¹³C et des ¹H à T = 310 K, sont regroupées dans les Tableaux 1 et 2.

On constate que seul le carbone C α présente des déplacements chimiques induits vers les champs forts dans l'intervalle de température que nous avons retenu (310 à 340 K). On retrouve d'ailleurs le même comportement: déplacements induits en champ fort, avec les carbones C α d'autres aminoacides et peptides monocarboxyliques complexant le Dy [1,2,19].

Pour déterminer la nature des perturbations au niveau de l'azote 14 et séparer les différentes contributions au moyen de rapports de déplacements induits et afin d'effectuer des comparaisons valables, les spectres RMN ¹⁴N et ¹H de la L-valine (C_L = 0,1 M) libre puis complexée par Dy ont été enregistrés dans les mêmes conditions expérimentales.

L'allure générale des spectres de résonance des protons et des carbones qui présentent le même nombre de raies, avec ou sans métal, les résultats des travaux effectués sur ce système et sur d'autres systèmes équivalents permettent de postuler: (i) que la vitesse d'échange entre les différentes espèces de la L-valine est rapide par rapport à l'échelle de temps de la RMN; (ii) que le complexe formé (de type 1:1) est à symétrie axiale; (iii) que l'effet diamagnétique est négligeable. Ce dernier point a par ailleurs été vérifié avec le La³⁺ et le Lu³⁺.

Détermination des paramètres thermodynamiques du système L-valine-Dy

L'établissement des paramètres thermodynamiques passe par celui des β à différentes températures.

Les incertitudes sur les mesures de déplacements induits des ¹³C (même avec un enrichissement isotopique de 85%) dûs essentiellement à l'élargisse-

TABLEAU 3

Constantes de complexation et déplacements induits limites à $T = 310$ K

	H α	H β	CH ₃ (1)	CH ₃ (2)
β	6,4	6,4	5,9	6,2
Δ	9146,3	5854,4	3480,5	2902,6
Δ_e	9372,0	5999,0	3314,0	2902,6

 Δ_e , Valeurs des déplacements induits limites calculées à partir de $\beta_m = 6,2$.

ment des raies de résonance des ^{13}C par le cation paramagnétique, et de ^{14}N par son moment quadrupolaire, ne permettent pas le calcul précis des paramètres intrinsèques β et Δ pour ces noyaux. Seules les données expérimentales des protons sont suffisamment précises pour l'autoriser. Ce calcul mené à l'aide des expressions 10 et 11 de la réf. 16 donne les résultats consignés dans les Tableaux 3 et 4.

Pour un même intervalle de température, les constantes de complexation du système L-valine–Dy sont toujours inférieures à celles du système L-carnosine–Dy [11].

Pour calculer les paramètres thermodynamiques du système L-valine–Dy nous avons utilisé les relations suivantes:

$$\Delta G^\ominus = -RT \ln \beta \quad (2)$$

$$d(\ln \beta)/d(1/T) = -\Delta H^\ominus/R \quad (3)$$

$$\Delta G^\ominus = \Delta H^\ominus - T \Delta S^\ominus \quad (4)$$

Les valeurs des paramètres thermodynamiques à $T = 298$ K sont données ci-dessous

$$\Delta H^\ominus = 2,72 \text{ kcal mol}^{-1}$$

$$\Delta G^\ominus = -1,02 \text{ kcal mol}^{-1}$$

$$\Delta S^\ominus = 12,4 \text{ u.e.}$$

Comme attendu, ces résultats confirment ceux obtenus sur d'autres systèmes équivalents [20]. La valeur positive de ΔH^\ominus montre que la réaction de formation du complexe est endothermique. Celle-ci représente en effet le

TABLEAU 4

Constantes de stabilité β_m et déplacements induits limites Δ du complexe L-valine–Dy

β_m	T (K)	H α	H β	CH ₃ (1)	CH ₃ (2)
5,5	300	9588,6	6206,3	3393,3	2972,9
6,2	310	9372,0	5999,0	3314,0	2902,6
7,4	320	8643,0	5591,0	3043,3	2689,8
8,1	330	8717,0	5558,5	2987,5	2656,0

Déplacements induits limites en Hz à 200 MHz; pD = 3,82 à 298 K.

bilan des enthalpies standards dues au déplacement puis au remplacement par la L-valine d'une ou plusieurs molécules d'eau de la première sphère d'hydratation du cation paramagnétique.

On devrait s'attendre à des progrès considérables dans les prévisions des réactions en solution aqueuse si l'on connaissait le nombre de molécules d'eau impliquées dans l'hydratation du cation métallique et comment les énergies libres standards d'hydratation sont liées à la structure des molécules.

Séparation des contributions dipolaires et de contact

Seuls les déplacements ayant pour origine une perturbation limitée au terme dipolaire étant exploitables dans un calcul conformationnel, une vérification de la nature de l'interaction s'impose donc pour chaque noyau observable avant toute étude conformationnelle.

Les méthodes de séparation à T constante ou à T variable, permettent en principe d'établir la nature des interactions au niveau des noyaux et de séparer les différentes contributions aux déplacements dipolaires.

Si la présence de contact au niveau du carbone $C\alpha$ ne fait aucun doute, dans les conditions actuelles on ne peut rien conclure sur la nature des interactions au niveau des autres noyaux.

Pour séparer les différentes contributions aux déplacements dipolaires, nous avons utilisé la méthode II décrite dans la réf. 11, basée sur une étude à T variable. Les rapports de déplacements chimiques induits sont consignés dans le Tableau 5.

Les noyaux $C\alpha$, $C\gamma_1$ et $C\gamma_2$ dont les rapports de déplacements induits évoluent avec la température (Tableau 5) présentent à la fois du contact et du pseudo-contact *, les autres noyaux n'étant soumis qu'à du pseudo-contact. La séparation des contributions dipolaires au moyen de la méthode

TABLEAU 5

Evolution des rapports de déplacements induits en fonction de la température

T (K)	$C0/C\beta$	$C0/C\alpha$	$C0/C\gamma_1$	$C0/C\gamma_2$	$H\alpha/H\beta$	$H\alpha/CH_3(1)$	$H\alpha/CH_3(2)$
300	—	—	—	—	1,56	2,83 ₈	3,22 ₅
310	5,84 ₈	6,99 ₃	10,98 ₈	12,82	1,56	2,84 ₇	3,23 ₃
320	5,86 ₅	7,19 ₄	11,12	12,90	1,56 ₇	2,85 ₈	3,22 ₁
330	5,84 ₈	7,57 ₇	11,23 ₆	13,10	1,57	2,86 ₂	3,22 ₆
340	(5,91)	7,87 ₄	(11,12)	(12,87)	—	—	—

Les valeurs mises entre parenthèses n'ont été utilisées ni pour séparer les contributions dipolaires et de contact ni pour établir les valeurs moyennes correspondantes.

* En admettant que l'évolution des rapports $C0/C\gamma_1$ et $C0/C\gamma_2$ avec la température n'est pas significative, l'autre alternative: absence de contact au niveau des noyaux $C\gamma_1$ et $C\gamma_2$ a été envisagée et testée dans le programme de calcul. Les résultats sont donnés dans le paragraphe détermination des pourcentages des rotamères.

TABLEAU 6

Déplacements dipolaires relatifs expérimentaux ^a et calculés

	C0/ C β ^b	C0/ C α	C0/ C γ_1	C0/ C γ_2	H α / C β ^{b,c}	H α / N ^d	H α / H β	H α / CH ₃ (1) ^e	H α ^e / CH ₃ (2)
Exp.	5,85	3,18	8,2	9,5	1,23	1,18	1,56	2,85	3,22 ₆
Calc.	5,89	3,2	8,1	9,4	1,31	1,17	1,53		

^a Les rapports sont donnés en l'état où nous les avons utilisés dans le programme de calcul.

^b Des études RMN sur quelques systèmes peptides monocarboxyliques-Dy montrent que les valeurs de ces rapports restent inchangées et égales à celles du système L-valine-Dy. Ce résultat constitue une preuve supplémentaire de l'absence de contact aux niveaux des noyaux C0, C β et H α et laisse fortement suggérer que le Dy occupe la même position au niveau du site de complexation des acides aminés et peptides monocarboxyliques.

^c Rapport déterminé graphiquement à 307 K par extrapolation à concentration nulle en lanthanide.

^d Malgré un fort élargissement des raies de résonance de ¹⁴N, les rapports H α /N mesurés à 320 K et à 330 K gardent sensiblement la même valeur. Nous avons donc émis l'hypothèse que 14 N n'était pas soumis à une perturbation de contact.

^e Devant l'incertitude sur la nature des perturbations au niveau des noyaux des groupements méthyles, ces deux rapports n'ont pas été pris en compte pour la détermination des pourcentages des rotamères.

II conduit aux données de déplacements dipolaires relatifs consignées dans le Tableau 6.

Si nous avons résolu le problème de la séparation des contributions dipolaires et de contact, nous en avons fait surgir de nouveaux en décelant du contact aux niveaux des noyaux C γ_1 et C γ_2 .

Alors qu'il est généralement admis, que la perturbation de contact transmise par les liaisons, s'atténue rapidement au travers celles-ci et disparaît totalement des noyaux séparés par trois liaisons du centre paramagnétique, on constate que C γ_1 et C γ_2 séparés chacun par 4 liaisons du cation Dy sont soumis à une perturbation de contact alors que C β , H α qui en sont séparés par 3 liaisons et C0 qui en est séparé par une, n'en présentent pas.

L'alternance des signes des déplacements induits des noyaux soumis à une perturbation de contact ($\delta C\alpha$ négatifs et $\delta C\gamma_1$, $\delta C\gamma_2$ positifs) ainsi que la présence d'une liaison de type π délocalisée sur les noyaux du groupement carboxylate, laissent supposer que la transmission du contact procède par un mécanisme de polarisation de spin via une délocalisation directe de spin [21].

Recherche de la position du cation paramagnétique

Le problème du nombre de paramètres ajustables comparé au nombre de données expérimentales se pose ici. Nous disposons en effet de quatre rapports expérimentaux de déplacements dipolaires pour six paramètres ajustables. Aussi avons nous retenu l'hypothèse de travail suivante: axe de

symétrie magnétique passant par le carbone du groupement carboxylate; ce qui ramène à trois le nombre de paramètres ajustables. Ce choix nous a été dicté a priori par les résultats des travaux effectués par d'autres auteurs [22] et qui montrent que pour les cations de lanthanides "lourds", l'axe de symétrie passe par le carbone du groupement carboxylate. Cette hypothèse est justifiée a posteriori par la cohérence des résultats obtenus, alors que les calculs que nous avons effectués avec des hypothèses différentes n'ont donné aucun résultat satisfaisant.

Le programme de calcul utilisé a été décrit précédemment [23]. Les coordonnées de la L-valine, rapportées à notre système d'axes sont celles obtenues à partir des données cristallographiques [24]. Pour chaque position du cation paramagnétique définie par les paramètres R , Ω et Φ on calcule la quantité $\Delta = (3\cos^2\theta - 1)/r^3$. On forme ensuite les rapports $\rho_{ij} = \Delta_i/\Delta_j$ relatifs aux noyaux i et j que l'on compare aux rapports expérimentaux correspondants en formant la variance normalisée. Une solution est possible lorsque les courbes d'isovariances se referment sur une valeur minimale. Celle-ci est retenue si les valeurs d'angles et de distances ainsi établies sont compatibles avec les rayons ioniques et les distances de van der Waals.

Pour le système L-valine-Dy les résultats suivants ont été obtenus

$$R = 3,2 \pm 0,1 \text{ \AA}$$

$$\Omega = 165 \pm 10^\circ$$

$$\Phi = 175 \pm 10^\circ$$

Le cation Dy est donc pratiquement situé sur la bissectrice de l'angle OCO. Ce résultat bien que comparable à celui obtenu par d'autres auteurs, s'en distingue cependant par une valeur de R nettement différente ($R = 3,2 \text{ \AA}$ au lieu de $3,8 \text{ \AA}$ avec la L-proline [2], $2,7 \text{ \AA}$ avec la L-alanine [1] ou $2,9 \text{ \AA}$ avec L-valine, résultat établi lors d'une étude précédente [30]) avec le cation situé hors du plan OCO.

Ces écarts peuvent s'expliquer si l'on considère que nous avons conclu, contrairement aux autres auteurs, à l'absence de contact aux niveaux de C0, C β et H α et réalisé la séparation des contributions dipolaires et de contact au niveau de C α à partir d'une méthode de séparation à T variable; ce qui par rapport aux méthodes de séparation à T constant présente l'avantage de ne pas faire intervenir A_{ij} . Refusé de faire intervenir dans notre programme de calcul les données relatives aux noyaux C γ_1 , C γ_2 et H β dont les positions sont variables par rapport à notre système d'axes.

Détermination des pourcentages de rotamères

La L-valine présente deux axes de rotation libre (C β -C γ_1 et C β -C γ_2) et un axe de pseudo-rotation (C α -C β) qui donne trois rotamères héxocycliques.

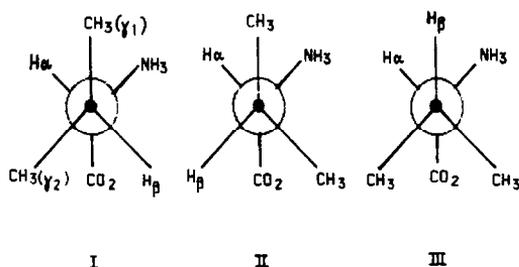


Fig. 3. Représentation en projection de Newman des rotamères de la L-valine.

Feeney et al. [25] ont établi les populations des rotamères représentés en projection de Newman sur la Fig. 3, et fait l'attribution des fréquences de résonances des noyaux $C\gamma_1$, $C\gamma_2$, $H\alpha$ et $H\beta$.

À partir de la position du cation paramagnétique défini précédemment ($R = 3,2 \pm 0,1 \text{ \AA}$, $\Omega = 165 \pm 10^\circ$, $\Phi = 175 \pm 10^\circ$), nous avons mené un calcul avec les trois rapports de déplacements dipolaires: $C0/C\gamma_1$, $C0/C\gamma_2$, $H\alpha/H\beta$ pour déterminer les pourcentages des trois rotamères I, II et III en formulant deux hypothèses de travail: $C\gamma_1$ en champ faible et $C\gamma_2$ en champ fort puis $C\gamma_1$ en champ fort et $C\gamma_2$ en champ faible.

La courbe: populations des rotamères = $f(\text{variance})$ passe par un minima pour $P_I = 0,17$, $P_{II} = 0,61$ et $P_{III} = 0,22$. Valeur de la variance 0,0010 pour la première hypothèse.

Dans le cas de la deuxième hypothèse on obtient: $P_I = 0,61$, $P_{II} = 0,17$, $P_{III} = 0,22$; valeur de la variance 0,0015.

Les résultats les plus cohérents sont pour $C\gamma_1$ en champ fort. Ces résultats (populations des rotamères et attribution des raies de résonance), établies indépendamment de la méthode utilisée par Feeney constitue une validation incontestable de notre méthode d'approche qui ne met pas en jeu les mêmes prémices ni les mêmes techniques. Les valeurs des déplacements dipolaires calculées sont regroupées dans le Tableau 6. Les variations des rapports de déplacements induits des noyaux $C\gamma_1$ et $C\gamma_2$ en fonction de la température étant relativement faibles, nous avons envisagé l'hypothèse que ces noyaux pouvaient n'être soumis qu'à une perturbation de pseudo-contact.

Un calcul mené à l'aide des rapports moyens $C0/C\gamma_1 = 11,1$; $C0/C\gamma_2 = 12,9$ et $H\alpha/H\beta = 1,56$, pour déterminer les populations des rotamères, conduit au meilleur accord pour $P_I = 0$, $P_{II} = 1$ et $P_{III} = 0$.

Les valeurs calculées correspondantes étant: $C0/C\gamma_1 = 7,81$, $C0/C\gamma_2 = 11,3$ et $H\alpha/H\beta = 1,42$. La valeur de la variance étant de 0,2152.

L'absence de cohérence entre les valeurs calculées et les valeurs expérimentales (les valeurs calculées sont toujours nettement inférieures aux valeurs expérimentales) permet de rejeter cette hypothèse de travail et renforce l'idée de la présence de contact au niveau de $C\gamma_1$ et $C\gamma_2$.

Vérification des résultats conformationnels par la mécanique moléculaire

Nous avons utilisé pour nos calculs d'énergie les programmes Genmol et Amber [26]. Les résultats conformationnels de la L-valine libre se confondant avec ceux de la L-valine complexant le dysprosium, nous avons donc négligé dans l'expression de l'énergie totale la contribution due aux interactions métal–ligand. En outre, les conformations établies par RMN étant considérées comme les plus stables, les calculs de leur énergie ont été menés sans que l'on cherche à les minimiser.

Nous avons considéré que l'énergie totale de notre système est la somme de six contributions indépendantes:

$$E = \Sigma E_S + \Sigma E_B + \Sigma E_C + \Sigma E_T + \Sigma E_H + \Sigma E_{VDW} \quad (5)$$

où E_S est l'énergie d'élongation d'une liaison, E_B est l'énergie d'une liaison covalente, E_C est l'énergie d'interaction coulombienne, E_T est l'énergie de déformation d'un angle de torsion, E_H est l'énergie d'une liaison hydrogène, et E_{VDW} est l'énergie de van der Waals.

Des études théoriques [27–29] et expérimentales [30–32] sur les interactions solvant–soluté ont montré que les molécules d'eau d'hydratation des peptides avaient pour effet d'affaiblir les liaisons hydrogène intramoléculaires et d'imposer aux chaînes latérales non polaires une réorganisation structurale de type "Cluster".

Bien que les diverses contributions énergétiques provenant de l'hydratation de la L-valine n'apparaissent pas de façon explicite dans l'expression de son énergie interne, nous les avons toutefois pris en considération, de façon implicite.

Pour les deux premiers termes (E_S et E_B), les paramètres utilisés sont ceux tirés des études par diffraction des rayons-X [24]. Pour le troisième terme (E_C), nous avons utilisé les constantes de Pèpe et Del Re [26]. Pour les trois autres termes, nous nous sommes servis des constantes de Schéraga [33].

Par ailleurs, nous avons été amené à considérer sur le groupement carboxylate une charge négative répartie équitablement entre les deux atomes d'oxygène (–0,5 sur chaque oxygène) et une charge positive sur l'atome d'azote ($^+NH_3$).

Les valeurs des énergies calculées pour les trois conformations de la L-valine sont:

$$\begin{array}{ll} P_I = 0,17 & E_I = -32,81 \text{ kcal mol}^{-1} \\ P_{II} = 0,61 & E_{II} = -33,17 \text{ kcal mol}^{-1} \\ P_{III} = 0,22 & E_{III} = -32,90 \text{ kcal mol}^{-1} \end{array}$$

TABLEAU 7

Valeurs des barrières énergétiques

	N_I/N_{II}	N_I/N_{III}	N_{III}/N_{II}
ΔE (Boltzmann) (kcal mol ⁻¹)	-0,75	-0,15	-0,6
ΔE_{exp} (kcal mol ⁻¹)	-0,36	-0,09	-0,27

Les valeurs des énergies calculées des conformations évoluent dans le même sens que la stabilité de leurs rotamères, définie par le pourcentage de leurs populations.

$$P_{II} > P_{III} > P_I \Leftrightarrow E_{II} < E_{III} < E_I \quad (6)$$

A partir des valeurs des populations des rotamères, nous avons, en utilisant la distribution de Boltzmann, calculé les différences d'énergie ΔE à 298 K entre les différents conformères

$$N_1/N_2 = e^{(E_2 - E_1)/kT} = e^{\Delta E/kT} \quad (7)$$

Le Tableau 7 réunit les valeurs des barrières énergétiques entre les différents rotamères. Dans tous les cas, $|\Delta E|$ reste toujours inférieure à 1 kcal mol⁻¹ [34] ce qui constitue une confirmation supplémentaire de la validité de nos résultats.

REFERENCES

- 1 A.D. Sherry et E. Pascual, *J. Am. Chem. Soc.*, 99 (1977) 5871.
- 2 M. Singh, J.J. Reynolds et A.D. Sherry, *J. Am. Chem. Soc.*, 105 (1983) 4172.
- 3 A.L. du Preez, S. Naidoo et R.J.P. Williams, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, (1988) 2315.
- 4 J. Ouarzazi, J.C. Mossoyan et D. Benlian, *Inorg. Chim. Acta*, 140 (1987) 373.
- 5 R.J. Gupta et P. Gupta, *J. Magn. Reson.*, 47 (1982) 344.
- 6 Y. Boulanger, P. Vinay et M. Desroches, *Biophys. J.*, 47 (1985) 553.
- 7 B.A. Wittenberg et R.K. Gupta, *J. Biol. Chem.*, 260 (1985) 2031.
- 8 F. Conti, M. Delfini, F. Scopinaro et U. Croatto, *Inorg. Chim. Acta*, 140 (1987) 355.
- 9 J.C. Mossoyan, M. Asso et D. Benlian, *J. Magn. Reson.*, 55 (1983) 188.
- 10 N. Jamin, D. Baron et N. Lumbroso-Bader, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. II*, (1985) 1.
- 11 J.C. Mossoyan, J. Ouarzazi et D. Benlian, *Magn. Reson. Chem.*, 25 (1987) 600.
- 12 J. Reuben et G.A. Elgavish, *J. Magn. Reson.*, 39 (1980) 421.
- 13 J. Reuben, *J. Magn. Reson.*, 50 (1982) 233.
- 14 M. Karplus et S. Karplus, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 69 (1972) 3204.
- 15 M. Asso, H. Zineddine et D. Benlian, *Int. J. Pept. Protein Res.*, 28 (1986) 437.
- 16 J.C. Mossoyan, M. Asso et D. Benlian, *J. Magn. Reson.*, 46 (1982) 289.
- 17 E. Giralt, R. Viladrich et E. Pedroso, *Org. Magn. Reson.*, 21 (1983) 208.
- 18 R.E. Richards et N.A. Thomas, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. II*, (1974) 368.
- 19 Article soumis à publication.
- 20 J. Ouarzazi, J.C. Mossoyan et D. Benlian, *Thermochim. Acta*, 130 (1988) 205.
- 21 W.D.W. Horrocks, *NMR of Paramagnetic Molecules*, Academic Press, New York, 1973, Chap. 4.

- 22 C.M. Dobson et B.A. Levine, *New Techniques in Biophysics and Cell Biology*, Vol. 3, Wiley, New York, 1976, Chap. 2.
- 23 J.C. Mossoyan, M. Asso et D. Benlian, *Org. Magn. Reson.*, 13(4) (1980) 287.
- 24 T.F. Koetzle, L. Golic, M.S. Lehmann, J.J. Verbit et W.C. Hamilton, *J. Chem. Phys.*, 60(12) (1974) 4690.
- 25 J. Feeney, P.E. Hansen et G.C.K. Roberts, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, (1974) 465.
- 26 G. Pèpe, B. Serres, D. Laporte, G. Del Re et C. Minichino, *J. Theor. Biol.*, 115 (1985) 571.
- 27 B.M. Pettitt et M. Karplus, *Chem. Phys. Lett.*, 121 (1985) 194.
- 28 P. Rossky et M. Karplus, *J. Am. Chem. Soc.*, 101 (1979) 1913.
- 29 M. Mezei, P.K. Mehrota et D.L. Beveridge, *J. Am. Chem. Soc.*, 107 (1985) 2239.
- 30 V. Madison et K.D.J. Kopple, *J. Am. Chem. Soc.*, 102 (1980) 4855.
- 31 M. Avignon, C. Carrigon-Lagrange et D. Bothorel, *Biopolymers*, 12 (1973) 1651.
- 32 A. Avignon et P. von Huang, *Biopolymers*, 9 (1970) 427.
- 33 G. Nemethy, M.S. Pottle et H.A. Scheraga, *J. Phys. Chem.*, 67 (1983) 1883.
- 34 E. Wyn-Jones et R.A. Pethrick, *Topics in Stereochemistry*, Vol. 5, Wiley-Interscience, New York, 1970, pp. 205–336.

SYMBOLES

- C_L, C_M concentration analytique totale (mol l^{-1}) en L-valine et en Dy
- β constante de stabilité pour l'équilibre de complexation
- Δ déplacement induit limit total. Différence entre le déplacement chimique d'un noyau donné dans le complexe totalement formé et le déplacement chimique du même noyau dans le ligand libre